

УРОВЕНЬ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА КЛЕТОК КЛАРА ПРИ РЕСПИРАТОРНОМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМЕ И ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИИ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Л.Н. Журавлева

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

CLARA CELL PROTEIN LEVELS IN RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME AND CONGENITAL PNEUMONIA IN PREMATURE INFANTS

L.N. Zhuravleva

Educational Institution "Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University"

Реферат

Патология дыхательной системы является одной из основных причин высокой заболеваемости новорожденных детей. И одним из наиболее тяжелых ее проявлений являются врожденные пневмонии и респираторный дистресс-синдром. Целью исследования явилось определение уровня белка клеток Клара в сыворотке крови и трахеальном аспирате (ТА) у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом и пневмонией. Под нашим наблюдением находилось 43 новорожденных с дыхательными расстройствами (25 детей с врожденной пневмонией и 18 детей с респираторным дистресс-синдромом), группу сравнения составили 20 новорожденных без патологии респираторного тракта. Мы выявили положительную корреляционную связь между тяжестью течения процесса и снижением уровня БКК в сыворотке на 1-2 суткам жизни у пациентов с неблагоприятным исходом ($r=0,58$, $p<0,001$). У недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией в неонатальном периоде содержание белка клеток Клара в трахеальном аспирате и сыворотке крови значимо выше, чем у детей с респираторным дистресс-синдромом. Низкое содержание белка клеток Клара в ТА (1257,6 пг/мл [961,4 - 1957,9]) и сыворотке крови (768,7 пг/мл [427,5 - 2357,7]) у недоношенных новорожденных на 1-2 сутки заболевания было связано с неблагоприятным исходом заболевания.

Ключевые слова: новорожденные, пневмония, респираторный дистресс-синдром, недоношенные дети, белок клеток Клара, иммунная система.

Abstract

The pathology of the respiratory system is one of the main reasons of the high morbidity in newborns. And one of its most severe manifestations is congenital pneumonia and respiratory distress syndrome. The aim of our study was to determine the level of Clara cell protein in blood serum and tracheal aspirate (TA) in newborns with respiratory distress syndrome and pneumonia. We observed 43 newborns with respiratory disorders (25 children with congenital pneumonia and 18 children with respiratory distress syndrome), the comparison group consisted of 20 newborns without respiratory tract pathology. We found a positive correlation between the severity of the process and the decrease in serum CCP levels on 1-2 days of life in patients with an unfavorable outcome of pneumonia ($r=0,58$, $p<0,001$). In preterm infants with congenital pneumonia in the neonatal period the Clara cell protein level in tracheal aspirate and blood serum is significantly higher than in children with respiratory distress syndrome. The low concentration of Clara cell protein in the TA (1257,6 pg/ml [961,4-1957,9]) and serum (768,7 pg/ml [427,5-2357,7]) in premature infants on day 1-2 of the disease was associated with an unfavorable outcome of the disease.

Key words: newborns, pneumonia, respiratory distress syndrome, premature newborns, Clara cell protein, immune system.

Поиск биомаркеров при заболеваниях легких у детей и новорожденных является актуальной областью исследований, которая будет способствовать пониманию патогенеза и молекулярных механизмов развития данной патологии. Так, например, дефицит сурфактантной системы легких является одним из па-

тогенетических звеньев развития респираторного дистресс-синдрома (РДС), врожденной пневмонии [1, 2, 3, 4]. Также было установлено, что одним из механизмов формирования дыхательных нарушений является повреждение альвеолярно-капиллярного барьера, что ведет к ухудшению газообмена, увеличению проница-

емости для белков. Целостность аэрогемодинамического барьера может быть оценена посредством измерения уровней специфических секреторных белков, называемых пневмопротеинами, один из которых – секреторный белок клеток Клара (БКК), секретируемый в больших количествах в просвет бронхиол клетками Клара. Клетки Клара представляют собой безреснитчатые клетки, не продуцирующие слизь, расположенные в терминальных бронхиолах [5, 6]. БКК состоит из двух идентичных субъединиц, ковалентно связанных посредством двух дисульфурных мостиков [5, 7, 8]. Белок клеток Клара (БКК) представляет собой протеин молекулярной массой 16 кДа. Белок клеток Клара также экспрессируется в незначительных количествах в простате, щитовидной железе, молочной железе, эпифизе, в беременной матке. В легких БКК является наиболее распространенным среди остальных протеинов внеклеточной жидкости. БКК появляется в амниотической жидкости на 15-й неделе беременности, и с увеличением срока беременности возрастает и его содержание в амниотической жидкости [7, 9].

Биологическая функция БКК остается не полностью исследованной, хотя было показано, что БКК связывается с липидными компонентами легочного сурфактанта, такими как фосфатидилхолин и фосфатидилинозитол, что позволяет предположить, что он может транспортировать или защищать эти фосфолипиды от процессов разрушения [7]. Кроме того, БКК отрицательно воздействует на процесс воспаления в трахеобронхиальном дереве, ингибируя активность фосфолипазы A2, фермента, ответственного за высвобождение предшественников простагландинов и лейкотриенов [9]. Действительно, было продемонстрировано, что БКК уменьшает воспаление легких у недоношенных детей с респираторным дистресс-синдромом [10], и продемонстрировано угнетение функции БКК у недоношенных детей, у которых развивается бронхолегочная дисплазия, что позволяет предположить, что структура и функция БКК являются критическими для процессов нормального гомеостаза бронхоальвеолярной жидкости [11].

Недавно БКК был предложен в качестве эпителиального маркера для установки факта наличия острого повреждения легких [12], и изменение экспрессии изоформы БКК было продемонстрировано в содержимом бронхоальвеолярного лаважа курящих и некурящих взрослых и детей с астмой и ринитом [13, 14].

В связи с этим целью исследования явилось определение уровня белка клеток Клара в сыворотке крови и трахеальном аспирате (ТА) у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом и пневмонией, а также оценка критериев риска развития пневмонии при респираторном дистресс-синдроме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данная работа проводилась в 2017-18 годах на базах роддомов г. Витебска и Витебского областного детского клинического центра. Под нашим наблюдением находилось 43 новорожденных с дыхательными рас-

стройствами (25 детей с врожденной пневмонией и 18 детей с респираторным дистресс-синдромом), группу сравнения составили 20 «условно здоровых» новорожденных без патологии респираторного тракта. Все дети с дыхательными расстройствами были недоношенные с гестационным возрастом 27–36 недель, массой тела при рождении 890–2 380 г и длиной от 34 до 45 см).

Объектом исследования была сыворотка (у всех детей) и трахеобронхиальный аспират (ТА) новорожденных детей, забор ТА проводился только в группах детей с респираторным дистресс-синдромом и пневмонией. У детей группы сравнения был проведен забор только сыворотки крови, т.к. они не находились на ИВЛ, и провести забор аспирата из трахеи не было реальной возможности. Забор трахеобронхиального аспирата у недоношенных новорожденных осуществлялся при санации дыхательных путей: в эндотрахеальную трубку вводилось 0,5 мл стерильного физиологического раствора с последующей его аспирацией. Исследование трахеобронхиального аспирата осуществляли на 1-2 сутки жизни. Белок клеток Клара в сыворотке крови исследовали на 1-2 день и на 10-14 день.

В сыворотке крови и ТА определяли содержание БКК методом ИФА при помощи поликлональных антител с использованием реактивов «Fine Test» фирмы «Wuhan Fine Biotech Co» (Китай). Учет реакции проводили на фотометре универсальном Ф 300 ТП (ОАО «Витязь» Беларусь). Результат выражали в пг/мл.

Осуществлялся тщательный сбор соматического и акушерско-гинекологического анамнеза матерей, оценка факторов риска развития осложнений в раннем периоде адаптации, клиническое наблюдение и лабораторное обследование (общий анализ крови, мочи, рентгенография грудной клетки, ультразвуковое исследование головного мозга и органов брюшной полости, биохимический анализ крови).

Статистическую обработку материала проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Также мы пользовались непараметрическими методами статистического исследования: критериями Манна-Уитни, критерием Вилкоксона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе данных анамнеза мы выявили, что у матерей новорожденных с респираторным дистресс-синдромом и врожденной пневмонией имелись факторы риска в виде отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза, экстрагенитальной патологии, патологического протекания беременности и родов, что способствовало возникновению антенатальной гипоксии плода. Однако при более пристальном изучении анамнеза у матерей новорожденных с пневмонией достоверно чаще имелись указания на искусственное прерывание предшествующих беременностей и наличие преждевременных родов в анамнезе. При анализе способа родоразрешения было установлено, что более часто рождались дети с РДС путем кесарева сечения (82,3%). У матерей пациентов с врожденной пневмо-

нией чаще наблюдали преждевременное излитие околоплодных вод (33,3%) и длительный безводный промежуток (46,7%).

Все новорожденные дети были взяты на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) в течение первых двух суток жизни: 24 ребенка были взяты на ИВЛ сразу после рождения, а 19 детей – в течение первых и/или вторых суток из-за нарастания дыхательной недостаточности. Длительность вспомогательной вентиляции составила в группе детей с РДС $4 \pm 2,1$ дня, а у детей с врожденной пневмонией достоверно более длительная, в среднем $9 \pm 3,7$ дня ($p < 0,05$).

При анализе течения неонатального периода у детей исследуемых групп было выявлено, что все новорожденные родились в тяжелом состоянии. В клинической картине (до взятия на ИВЛ) у всех детей наблюдалась тахипноэ (более 60-70 дыханий в минуту) или эпизоды апноэ, экспираторные шумы (по типу грантинга), втяжение податливых участков грудной клетки, вялость, бледность, сероватый оттенок окраски кожи, вздутие живота, неусвоение пищи, тахикардия (более 180 уд/мин). Но более тяжелое состояние при рождении, обусловленное дыхательной и полиорганной недостаточностью, значительной степенью недоношенности, достоверно чаще отмечалось у детей с врожденной пневмонией ($p < 0,05$). Все дети родились с низкой оценкой по шкале Апгар, но более низкая оценка отмечалась у пациентов с врожденной пневмонией ($p < 0,05$). Дыхательная недостаточность III степени также чаще наблюдалась у новорожденных с врожденной пневмонией. С целью купирования симптомов дыхательной недостаточности всем новорожденным проводили вспомогательную респираторную терапию. Рентгенологические изменения при врожденной пневмонии у недоношенных новорожденных весьма сложно трактовать вследствие особенностей в становлении кардиореспираторной адаптации при рождении и анатомо-физиологических особенностей бронхолегочной системы [15]. Рентгенологически у детей с РДС наблюдались снижение пневматизации легочных полей с участками рассеянных мелких ателектазов, формирование воздушной бронхограммы. В группе детей с врожденной пневмонией (82,3%) рентгенологически отмечалось усиление бронхосудистого рисунка и локальное понижение прозрачности легочных полей.

Все дети получали этиотропную, инфузионную и посиндромную медикаментозную терапию с учетом кислотно-щелочного состояния, уровня гемоглобина, электролитного состава и биохимических показателей сыворотки крови.

В группу сравнения (контрольную) группу вошли «условно» здоровые недоношенные новорожденные

дети ($n=20$) без признаков неонатальной пневмонии, респираторного дистресс-синдрома и дыхательной недостаточности. В контрольной группе гестационный возраст (ГВ) составлял 34-36 недель гестации, масса тела при рождении 1890 - 2490 г. Всем детям с отклонениями в неврологическом статусе и другими состояниями в раннем периоде адаптации создавался охранительный режим, проводилась гемостатическая терапия, витаминотерапия, по показаниям были назначены ноотропные препараты.

В результате исследования был установлен уровень БКК в ТА и сыворотке крови у недоношенных новорожденных с РДС и врожденной пневмонией (рисунок 1).

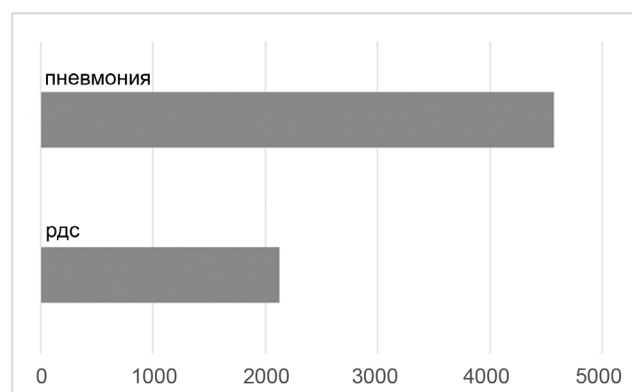


Рисунок 1. Содержание БКК в содержимом трахеи при РДС 1 типа и врожденной пневмонии.

Уровень БКК в ТА у детей с врожденной пневмонией ($4567,9 [2546,4-6247,2]$ пг/мл) был значительно выше, чем у детей, имевших лишь признаки РДС ($2123,4 [961,2-3251,4]$ пг/мл).

Это можно объяснить ростом пролиферативной активности клеток Клара и увеличением синтеза ими специфического противовоспалительного протеина в ответ на развитие воспаления в легочной ткани. При исследовании уровня БКК в трахеальном аспирате на 10-14 день в обеих группах данный показатель был повышен и составил $5674,3$ пг/мл (25–75 IQR $2543,1 - 7689,04$ пг/мл) и $5231,5$ пг/мл (25–75 IQR $3578,2 - 6894,9$ пг/мл). Мы не получили статистического достоверного различия по уровню БКК между исследуемыми группами пациентов. Это можно объяснить тем фактом, что все дети с РДС, у которых нам удалось забрать ТА (9 пациентов), к 10-14 суткам имели уже осложнения в виде двухсторонней пневмонии (таблица 1).

Уровень БКК в сыворотке крови у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией также был достоверно выше, чем у детей с РДС (таблица 1). Это объясняется более выраженным сочетанным (инфекцион-

Таблица 1. Уровень БКК в сыворотке крови у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией

Дни наблюдения	Дети с РДС (n=18)	Дети с врожденной пневмонией (n=25)	Группа сравнения (n=20)
1-2 день	853,2 [427,5–1257,4]*	2578,2 [1557,2–4156,6]***	254,2 [105,4–374,5]**
10-14 день	654,1 [378,8–979,3]*	1246,7 [946,6–1879,4]***	211,7 [90,4–317,2]**

* $P_{1-2} < 0,001$; ** $P_{1-3} < 0,01$; *** $P_{2-3} < 0,001$

ным и механическим в результате ИВЛ) повреждением альвеолярно-капиллярного барьера с повышением его проницаемости и выходом БКК в кровяное русло у новорожденных с врожденной пневмонией.

К концу 2 недели жизни перенесших врожденную пневмонию отмечалось значимое снижение уровня БКК в сыворотке крови (1246,7 пг/мл) по сравнению с исходным (2578,2 пг/мл, $p < 0,01$), что связано с постепенным морфофункциональным восстановлением альвеолярно-капиллярного барьера и элиминацией инфекционных агентов (таблица 1). У новорожденных с РДС существенную динамику содержания БКК в сыворотке крови к концу неонатального периода не наблюдали.

Также в ходе исследования все пациенты были разделены на две подгруппы: группу I составили 28 детей с благоприятным исходом заболевания и группу II ($n=15$) – с неблагоприятным. Под неблагоприятным исходом мы понимали длительное нахождение на ИВЛ, формирование бронхолегочной дисплазии (БЛД) и летальный исход (2 случая).

Все дети с неблагоприятным исходом имели ЭНМТ и ОНМТ при рождении, а гестационный возраст составлял 27–33 недели. У этих детей содержание БКК в ТА и сыворотке крови было достоверно ниже, чем у детей, выздоровевших от пневмонии (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация БКК в исследуемых группах детей 1-2 день

Объект исследования	Группа I ($n=28$) благоприятный исход	Группа II ($n=15$) неблагоприятный исход
ТА	3256,4 [2145,2–6257,8]*	1257,6 [961,4–1957,9]*
Сыворотка крови	2386,3 [1427,5–3257,6]*	768,7 [427,5–2357,7]*

* $P_{1-2} < 0,001$

Это, вероятно, объясняется невозможностью у них синтеза БКК в количестве, необходимом для антиинфекционной защиты легких. Возможно, это связано с выраженным повреждением ткани легкого еще на антенатальном этапе развития плода в результате инфекции. Также нельзя исключить роль генетических факторов, приводящих к недостаточной продукции БКК клетками респираторного эпителия. Невысокое содержание БКК в ТА обуславливает низкое его содержание и в сыворотке крови у детей с неблагоприятным исходом.

Проанализировав взаимосвязь между уровнем белка Клара в периферической крови в сыворотке крови, трахеальном аспирате и тяжестью состояния новорожденных и течением воспалительного процесса, выявляется положительная корреляционная связь между тяжестью течения и снижением уровня БКК в сыворотке на 1-2 сутки жизни у пациентов с неблагоприятным исходом респираторных нарушений ($r = 0,58$, $p < 0,001$).

Таким образом, невысокое содержание белка клеток Клара как в трахеальном аспирате, так и в сыворотке крови может быть рассмотрено как критерий неблагоприятного исхода пневмонии и респираторного дистресс-синдрома у новорожденного.

ВЫВОДЫ

1. У недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией в неонатальном периоде содержание белка клеток Клара в трахеальном аспирате и сыворотке крови значимо выше, чем у детей с респираторным дистресс-синдромом.

2. Низкое содержание белка клеток Клара в содержимом трахеи и сыворотке крови у недоношенных новорожденных на 1-2 сутки заболевания было связано с неблагоприятным исходом заболевания, что может служить критерием неблагоприятного исхода пневмонии и респираторного дистресс-синдрома у новорожденного в последующем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hooven, T.A. Pneumonia / T.A. Hooven, R.A. Polin // Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. 2017. – Vol. 22. – №4. – P. 206–213.
2. Edwards M.O. Respiratory Distress of the Term Newborn Infant / M.O. Edwards, S.J. Kotecha, S. Kotecha // Paediatr. Respiratory Reviews. – 2013. – V. 14. – №1. – P. 29–37.
3. Phua, J. Acute respiratory distress syndrome and the Art of War / J. Phua, J.R. Badia, N.D. Ferguson // Crit Care Med. – 2009. – V. 37. – P. 1798–1799.
4. Nissen, M.D. Congenital and neonatal pneumonia / M.D. Nissen // Paediatr. Respir. Rev. – 2007. – V. 8. – №3. – P. 195–203.
5. Clara cell protein expression in human neonates during respiratory distress syndrome / J. Arias-Martinez, M. Palacios-Sanchez, D. Delgado-Franco, [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2012. – V. 29. – №5–6. – P. 753–760.
6. Mukherjee, A.N. Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobulin superfamily / A.N. Mukherjee, Z. Zhang, B.S. Chilton // Endocr. Rev. – 2007. – V. 28. – P. 707–725.
7. Singh, G. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10) / G. Singh, S.L. Katyal // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2007. – V. 17. – P. 141–143.
8. Broeckaert, F. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker / F. Broeckaert, A. Bernard // Clinical and Experimental Allergy. – 2000. – V. 30. – №4. – P. 469–475.
9. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker / F. Broeckaert, A. Clippe, B. Knoop, [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2000. – V. 923. – P. 68–77.
10. The safety, pharmacokinetics, and antiinflammatory effects of intratracheal recombinant human Clara cell protein in premature infants with respiratory distress syndrome / C.R. Levine, I.H. Gewolb, K. Allen, [et al.] // Pediatr

Res.–2005.–V.58.– P.15-21.

11. Clara cell secretory protein oxidation and expression in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia / P.L. Ramsay, F.J. DeMayo, S.E. Hegemier, [et al.] // Am J Respir Crit Care Med.–2001.–V. 164.–P.155-161.
12. Clara cell protein (CC16), a marker of lung epithelial injury, is decreased in plasma and pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury / J.A. Kropski, R.D. Fremont, C.S. Calfee, [et al.]//Chest.–2009. – V. 135.–P. 1440-1447.
13. Lindahl, M. Demonstration of different forms of the anti-inflammatory proteins lipocortin-1 and Clara cell protein-16 in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids / M. Lindahl, J. Svartz, C. Tagesson // Electrophoresis.–1999.–V.20.–P. 881-890.
14. Bronchoalveolar lavage in children/J. de Blic, F. Midulla, A.Barbato, [et al.]//Eur Respir J.–2000.–V.15.–P. 217-231.
15. Неонатология–национальное руководство/под ред. академика РАМН проф.Н.Н. Володина/.–М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.–749 с.

Автор выражает благодарность научному сотруднику НИЛ УО «ВГМУ» Ж.В. Хотетовской за помощь в проведении лабораторной части исследования.